

WYKORZYSTANIE ENDOCYTOZY KIEROWANEJ RECEPTORAMI DO SELEKTYWNEGO WPROWADZANIA GENÓW W TERAPII GENOWEJ

TARGETED GENE DELIVERY BY RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS FOR GENE THERAPY

Marta MICHALIK

Zakład Biologii Komórki Instytutu Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego
Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Wykorzystanie procesu endocytozy kierowanej receptorami (ER) umożliwiło opracowanie metod wektorowych ukierunkowanego wprowadzania makrocząsteczek do komórek docelowych. W artykule przedstawiono różne metody wprowadzania DNA do komórek oparte na wykorzystaniu procesu endocytozy. Szczegółowo omówiono wprowadzanie genów terapeutycznych do komórek docelowych za pośrednictwem niewirusowych wektorów zwanych koniugatami molekularnymi. Opisano konstrukcję tych wektorów, omówiono domeny, które wiążą DNA, ligandy odpowiedzialne za wiązanie z receptorami w błonie komórek docelowych, składniki, które ułatwiają uwalnianie wektora z endosomu oraz czynniki sygnałowe kierujące wprowadzane DNA do jądra komórki. Przedstawiono zalety i ograniczenia koniugatów molekularnych jako wektorów służących do wprowadzania genów terapeutycznych do komórek i perspektywy ich wykorzystania dla celów terapii genowej *ex vivo* i *in vivo*.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; *supl.* 16: 135–157)

Słowa kluczowe: terapia genowa, wprowadzanie genów, wektory niewirusowe, koniugaty molekularne, endocytoza kierowana receptorami

Summary: Receptor-mediated endocytosis (RME) is a type of delivery system by which therapeutic agents can be specifically transported to their targets. In this paper methods of delivery of macromolecules via RME are discussed. This review focuses on molecular conjugate vectors as a delivery system of therapeutic genes to targeted cells. Characteristic of DNA-binding agents, together with further factors such as cell-specific ligands, endosomal escape and nuclear localisation are discussed. Advantages and disadvantages of molecular conjugates and future perspectives of application of these vectors for gene therapy are considered.

(*Advances in Cell Biology* 2001; *supl.* 16: 135–157)

Key words: gene therapy, gene delivery, non-viral vectors, molecular conjugates, receptor-mediated endocytosis

1. WSTĘP

Postęp w biologii molekularnej i biotechnologii dokonany w ostatnich 25 latach umożliwił wprowadzanie nowych metod do współczesnej medycyny. Do takich metod zalicza się m.in. terapię genową. Wiele chorób zostało rozpoznanych jako choroby genetyczne, które mają podłoże w nieprawidłowym funkcjonowaniu pojedynczego genu lub zespołu genów. Najskuteczniejszym sposobem leczenia chorób genetycznych wydaje się być stosowanie terapii genowej, która umożliwia leczenie przez naprawę, zamianę lub zablokowanie funkcji genu odpowiedzialnego za wystąpienie danej jednostki chorobowej. Podstawą tej metody jest wprowadzenie do zmienionych chorobowo komórek odpowiedniej informacji genetycznej, fragmentu DNA zastępującego własny, zmieniony gen i tym sposobem „naprawienie” niewłaściwie funkcjonujących komórek, tkanek, narządów lub całych organizmów [19], względnie selektywne blokowanie ekspresji i translacji odpowiednich genów [59].

Terapia genowa może dotyczyć komórek rozrodczych, zygoty przed pierwszym podziałem lub komórek somatycznych. Zabiegi na komórkach rozrodczych człowieka ze względu na nieprzewidywalność skutków w odniesieniu do potomstwa i ze względów etycznych są zabronione. Natomiast zabiegi prowadzone na komórkach somatycznych mogą umożliwić korygowanie defektów zarówno genetycznych, jak i niegenetycznych. Dlatego w wielu ośrodkach badawczych prowadzone są próby wprowadzania genów terapeutycznych do komórek somatycznych metodami *in vitro* oraz próby zastosowania terapii somatycznej do leczenia różnych schorzeń, metodą *ex vivo* lub *in vivo*. Chorobami, które próbuje się zwalczać tymi metodami, są zarówno choroby genetyczne: mukowiscydoza [19, 83, 100], hemofilia [48, 114], ADA (ostry złożony zespół niedoboru odporności) [27, 35], fenyloketonuria [43], adrenoleukodystrofia [92], choroba Gauchera [28], dystrofia mięśniowa Duchennea [42] i inne, jak również choroby nabyte, między innymi: nowotwory [13, 41, 55, 71, 73, 86], choroby układu krążenia [25, 29, 91], choroby neurodegeneracyjne [40, 58], AIDS [13, 43, 56, 61, 67].

Zasadniczą trudnością w rozwoju terapii genowej (dotychczas nie w pełni rozwiązana) jest opracowanie specyficznego, powtarzalnego i wydajnego sposobu wprowadzania genu terapeutycznego do organizmu chorego, a najlepiej do wybranego narządu lub tkanki. Drugą istotną trudnością napotykaną po transfekcji komórek jest zapewnienie właściwej regulacji ekspresji wprowadzonego genu.

2. WPROWADZANIE GENÓW DO KOMÓREK EUKARIOTYCZNYCH

Bardzo trudne jest wprowadzanie fragmentów DNA (lub plazmidów z wbudowanym genem terapeutycznym) do komórek docelowych z odpowiednią wydajnością i swoistością oraz z zachowaniem niezmienionej struktury i właściwości wprowadzanego genu, tak by mógł on ulec ekspresji w komórce, do której zastał wprowadzony. Opracowano wiele różnych metod wprowadzania makrocząsteczek do komórek. Można wśród nich wyróżnić:

I. metody fizyko-chemiczne, takie jak:

- bezpośrednie wprowadzenie za pomocą mikroiniekcji [11],
- elektroporacja [2],
- techniki biobalistyczne [5],
- odwracalna perforacja i permeabilizacja błon [53],
- precypitacja z CaPO_4 [103];

II. metody wykorzystujące takie przenośniki, jak:

- liposomy (liposomy kationowe, anionowe, obojętne, proteoliposomy) [64, 82],
- wektory wirusowe [54, 79],
- wektory niewirusowe [14, 17].

Do pierwszej grupy metod należą techniki, w których DNA wprowadza się do komórek stosując metody fizyczne lub chemiczne [86]. Metody te są zwykle uciążliwe w stosowaniu, charakteryzują się różną wydajnością, która zależy od rodzaju metody. Są dość powszechnie stosowane w badaniach podstawowych i mogą być przydatne w inżynierii komórkowej wykorzystywanej w biotechnologii, ale trudno sobie wyobrazić ich użycie w terapii *in vivo*. Jak dotychczas służą przede wszystkim do konstruowania linii komórek produkujących wektory wirusowe.

Do drugiej grupy metod należą techniki, w których konstruuje się „przenośniki” (wektory) zdolne do przekazywania informacji genetycznej do komórek. Dopiero opracowanie systemów „przenośnikowych” (liposomy i wektory) umożliwiło badania zmierzające do wydajnego i selektywnego wprowadzania genów do komórek docelowych. Wśród konstruowanych wektorów można wyróżnić:

I. wektory wirusowe, takie jak:

- retrowirusowe [45],
- adenowirusowe [20, 105],
- tworzone z wirusów adenosatelitarnych (ang. *Adeno-Associated Virus*) [9, 89],
- oparte na herpeswirusach typu 1 (ang. *Herpes Simplex Virus*) [95],
- oparte na innych wirusach (*Polio*, *Vaccinia*, *Sindbis*) [51, 75];

II. wektory niewirusowe, takie jak np.:

- koniugaty molekularne [34].

Należy zaznaczyć, że dotychczas tylko wektory retrowirusowe, adenowirusowe i lipofekcja są stosowane w terapii w niektórych ośrodkach klinicznych [1, 27, 45], a w ostatnich latach wektory tworzone z wirusów adenosatelitarnych i wirusów *Herpes Simplex* zostały dopuszczone do prób klinicznych [30, 95]. Pozostałe metody to systemy eksperymentalne, testowane na zwierzętach i w hodowlach komórek *in vitro*.

Tworzenie różnych typów liposomów, sposoby pułapkowania w ich wnętrzu genów terapeutycznych, czynniki ułatwiające fuzję liposomów z błonami komórek docelowych i sposoby uwalniania DNA do cytoplazmy komórek zostały opisane w pracach przeglądowych [46, 64, 82, 112]. Również, wykorzystanie wirusów jako wektorów w terapii genowej, wydajność tych wektorów, efekty uboczne związane z ich wprowadzaniem do komórek i możliwości zastosowań klinicznych tych wektorów zostały omówione w wielu pracach przeglądowych zarówno w języku angielskim [40, 57, 74, 79, 92], jak i języku polskim [43, 44, 54], dlatego pominię przedstawianie tych wektorów w niniejszym artykule ograniczając się do omówienia wektorów niewirusowych zwanych koniugatami molekularnymi (ang. *molecular conjugates*) albo polipleksami białko/DNA (ang. *protein/DNA polyplexes*).

3. ENDOCYTOZA RECEPTOROWA NARZĘDZIEM DO SPECYFICZNEGO WPROWADZANIA KONIUGATÓW MOLEKULARNYCH DO KOMÓREK DOCELOWYCH

Metoda wprowadzania DNA do komórek przy użyciu wektorów zwanych koniugatami molekularnymi oparta jest na wykorzystaniu endocytozy kierowanej receptorami (por. rys. 2), która jest wysoce specyficznym i selektywnym procesem transportu substancji zewnątrzkomórkowych do cytoplazmy, z udziałem błony komórkowej. Ligandy obecne w środowisku po związaniu z komplementarnymi receptorami na powierzchni komórki są internalizowane i transportowane do wnętrza komórki jako kompleksy makrocząsteczek z receptorami, zawarte w pęcherzykach zwanych endosomami [66]. Endosomy nie są przemieszczane w komórce w sposób przypadkowy, ale są kierowane do odpowiednich przedziałów cytoplazmy przez specyficzne białka odpowiedzialne za kierunkowość transportu wewnątrzkomórkowego i fuzję endosomów z pęcherzykami przedziału docelowego lub błoną komórkową (białka z rodziny Rab, białka ARF, t-SNARE i v-SNARE) [62, 63, 80].

Los zinternalizowanych kompleksów ligand-receptor zależy przede wszystkim od typu komórki, w której zachodzi endocytoza oraz rodzaju ligandu związanego przez specyficzny receptor [63, 93]. Zazwyczaj w kwaśnym pH endosomu ligandy, takie jak np. LDL (lipoproteiny o małej gęstości), EGF, PDGF, kalcitonina, kate-

cholamina, insulina, interferon oddysocjują od receptorów. Receptory w pęcherzykach ulegających recyrkulacji (ang. *recycling endosomes*) powracają do tej samej domeny błony komórkowej, a ligandy zawarte w endosomach wczesnych przechodząc przez kolejne przedziały w komórce (endosomy sortujące, późne endosomy) kierowane są do lizosomów, w których ulegają degradacji [66]. Gdy w kwaśnym pH endosomu ligand pozostaje związany z receptorem (np. transferyna), wówczas zachodzi recyrkulacja zarówno receptorów, jak i ligandów, przy czym ligandy są uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a receptory zostają wbudowane do błony komórkowej. W komórkach spolaryzowanych, w których zachodzi proces transcytozy, często ligandy i receptory transportowane są przez komórkę i wbudowywane do błony komórkowej po przeciwległej stronie komórki (np. IgA). Gdy ligandami w endocytozie receptorowej są wirusy lub toksyny, wtedy ich receptory ulegają recyrkulacji do błony komórkowej, ale ligandy są uwalniane bezpośrednio do cytoplazmy [93].

Komórki ssaków mają właściwe sobie receptory powierzchniowe, które umożliwiają wiązanie i pobieranie na drodze endocytozy różnych ligandów (por. tab.1). Niektóre typy komórek wykazują na swojej powierzchni znacznie większą ekspresję specyficznych receptorów dla określonych związków (białek, peptydów, wielocukrów) niż inne komórki tego samego organizmu, narządu lub tkanki. Znajomość ligandów dla receptorów powierzchniowych specyficznych dla określonego typu komórek ssaków została wykorzystana w konstrukcji wektorów do selektywnego wprowadzania DNA do wybranych komórek docelowych [17, 47]. Wektory te, zwane koniugatami molekularnymi (ang. *molecular conjugates*), składają się z ligandu połączonego kowalencyjnie z białkiem lub peptydem, z którym dzięki oddziaływaniom elektrostatycznym związane jest terapeutyczne DNA.

Pierwszy koniugat molekularny skonstruowali Wu G. i Wu C. w 1987 r. Wybrany przez nich ligandem kowalencyjnie związanym z kompleksem białko/DNA (polipleks) była glikoproteina asialoorosomukoid (ASOR), która jest specyficznie pobierana w drodze endocytozy receptorowej przez komórki wątrobowe. Autorzy ci plazmid pSV2CAT z wbudowanym genem dla bakteryjnego enzymu CAT (acetylotransferazy chloramfenikolu) wprowadzili w polipleksie ASOR/białko/DNA do komórek HepG2, które wykazują silną ekspresję receptorów asialoglikoproteinowych (250 000 receptorów/komórkę). Komórki HepG2 wykazywały wysoką wydajność transfekcji i ekspresję genu CAT [108]. Doświadczenia przeprowadzone *in vitro* zostały potwierdzone przez badania na zwierzętach. Wprowadzenie myszom za pomocą dożylniej iniekcji doogonowej koniugatu molekularnego ASOR/białko/CAT, ze znakowanym radioaktywnie genem, wykazało znacznie wyższą radioaktywność w komórkach wątroby niż w innych komórkach organizmu (ok. 85%). Gdy samo znakowane DNA (nie wbudowane do koniugatu molekularnego) wprowadzono bezpośrednio do krwioobiegu zwierzęcia, tylko 17% znakowanego DNA znajdowano w komórkach wątroby [109]. Obiecujące wyniki pierwszych prób zastosowania

TABELA 1. Typy ligandów pobierane przez komórki ssaków w procesie endocytozy kierowanej receptorami (wg [93] zmodyfikowane)

Hormony i czynniki wzrostu	Toksyny i lektyny	Wirusy i bakterie	Białka przenośnikowe surowicy i przeciwciała	Witaminy i jony metali
Kalcitonina Katecholamina Glukagon Insulina Parathormon Progesteron Oksytocyna Wazopresyna Tyreotropina Prolaktyna Hormon lutenizujący Kortykotropina Somatotropina Somatostatyna Somatoliberyna Gonadoliberyna Tyreoliberyna Kortykoliberyna Interferon EGF NGF PDGF FGF	Toksyny bakteryjne: przecinkowca cholery dyfterotoksyna egzotoksyna <i>Pseudomonas</i> termolabilna toksyna <i>Escherichia coli</i> enterotoksyny A i B szczepów <i>Staphylococcus</i> Toksyny grzybicze: sarcyna amanityna Toksyny roślinne: rycyna saporyna modecyna abryna gelonina nigryna b Lektyny: konkanawalina A aglutymina z zarodków pszenicy lektyna z orzeszków ziemnych	Adenowirus Wirus mięsaka Rousa Rotawirus Reowirus Wirus niedoboru odporności (HIV) <i>Semliki forest virus</i> <i>Vesicular stomatitis virus</i> <i>Varicella Zoster</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> Szczepki <i>Klebsiella</i> Szczepki <i>Enterobacter</i> Szczepki <i>Serratia</i>	LDL IgE IgG wiążące receptor Fc IgG matczyne Polimeryczna IgA Transferyna Transkobalamina Białka żółtka	Żelazo/transferyna Kwas foliowy Ryboflawina Witamina B ₁₂

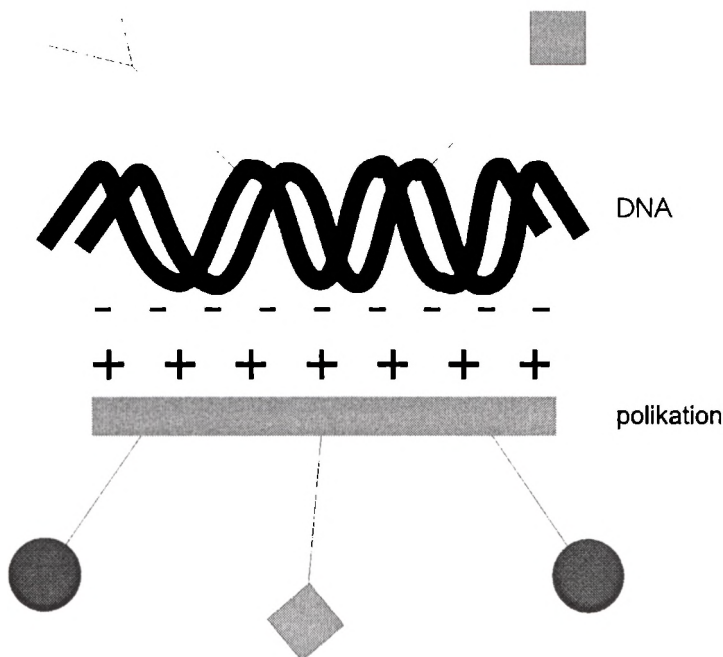
Sposowane skróty: EGF – epidermalny czynnik wzrostowy, NGF – czynnik wzrostu nerwu, PDGF – płytkowy czynnik wzrostowy, FGF – fibroblastyczny czynnik wzrostowy, LDL – lipoproteiny o małej gęstości, IgE – immunoglobulina E, IgG – immunoglobulina G, IgA – immunoglobulina A.

koniugatów molekularnych do selektywnego wprowadzania genów do określonych komórek zapoczątkowały w wielu pracowniach badania nad opracowaniem nowych niewirusowych wektorów dogodnych dla terapii genowej różnych schorzeń.

4. KONIUGATY MOLEKULARNE

Schemat budowy koniugatów molekularnych zwanych też polipeksami białko/DNA przedstawia rysunek 1. Wektory te złożone są zazwyczaj z 4 domen:

- 1 – domena, która wiąże wprowadzane DNA (ang. *DNA-binding agent*),
- 2 – ligand, który specyficznie wiąże się z odpowiednim receptorem na błonie komórki docelowej (ang. *cell-specific targeting ligand*),
- 3 – czynnik lizujący, który umożliwia uwolnienie wektora z endosomu do cytoplazmy (ang. *endosomal lysis agent*),
- 4 – domena ułatwiająca wprowadzenie genu do jądra komórkowego (ang. *nuclear localization signals*).



RYSUNEK 1. Schemat budowy koniugatu molekularnego. Gen terapeutyczny lub oligonukleotyd (DNA) połączony jest wiązaniem jonowym z czynnikiem wiążącym (polikation), z którym związane są również: ligand (kwadrat), który specyficznie wiąże się z odpowiednim receptorem na błonie komórki docelowej, czynnik lizujący (trójkąt), który umożliwia uwolnienie wektora z endosomu do cytoplazmy oraz domena (koło) ułatwiająca wprowadzenie genu do jądra komórkowego; (na podstawie danych [17, 39, 94, 101])

4.1. Domeny, które wiążą DNA (ang. *DNA-binding agents*)

W koniugatach molekularnych odpowiednio dobrany gen terapeutyczny, który ma być wprowadzony do komórki docelowej, musi zostać połączony z domeną wiążącą w taki sposób, aby nie uszkodzić struktury wprowadzanego genu i umożliwić skonstruowanie wektora o jak najkorzystniejszych parametrach dla pobrania go przez komórkę w drodze endocytozy.

Najpowszechniej stosowanym do wiązania DNA czynnikiem jest poli-L-lizyna (PLL), polikation złożony z powtarzających się reszt lizyny o długości cząsteczki od 15 do około 1000 reszt lizynowych [17, 34, 99, 101, 108]. Powstanie kompleksu PLL-DNA następuje przez utworzenie wiązania jonowego między obdarzonymi ładunkiem dodatnimi grupami aminowymi PLL, a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA. Podczas reakcji wiązania zachodzi zmiana konformacji cząsteczki DNA z kowalencyjnie ciągłej struktury kolistej lub superhelikalnej na strukturę pierścieniową (*toroid structure*). Powstające struktury mają średnice 80–100 nm, co umożliwia ich pobieranie w drodze endocytozy przez większość komórek ssaków [18, 98]. Jak wykazano doświadczalnie, wielkość cząsteczki PLL ma duży wpływ na kształt, wielkość i ładunek powstających kompleksów PLL-DNA [34]. Najbardziej stabilne i skondensowane polipleksy, o średnicy do 80 nm, uzyskiwano przy użyciu dużych cząsteczek PLL, o długości łańcucha liczącego ponad 1000 reszt lizynowych [110].

W pracowni Wagnera syntetyczne polikationy zostały wykorzystane jako domeny wiążące DNA w koniugatach molekularnych. Polietylenoimina (PEI), polimer o silnie rozgałęzionych łańcuchach, zsyntetyzowany z pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowych amin, został wykorzystany do wprowadzenia kilku oligonukleotydów lub plazmidów do różnych typów komórek w hodowli *in vitro* [7]. PEI jako polikation ma zdolność wiązania DNA podobnie jak poli-L-lizyna, ale równocześnie pośredniczy w uwalnianiu DNA z endosomu do cytoplazmy. Dzięki specyficznej budowie cząsteczki, która posiada końcowe grupy aminowe zdolne do jonizacji w pH 6,9 i wewnątrzcząsteczkowe grupy aminowe zdolne do jonizacji w pH 3,9, polikation PEI wywołuje zmiany w pH wewnątrz pęcherzyka endocytarnego, które prowadzą do pęczenia pęcherzyka i uwolnienia koniugatu z endosomu [7]. Doświadczalnie wykazano, że uwolnione do cytoplazmy polipleksy PEI/DNA bardzo łatwo wnikają do jądra komórkowego [36]. Przeprowadzone próby transfekcji komórek zarówno w hodowli *in vitro*, jak i *in vivo* wykazały, że polipleksy ligand/PEI/DNA (np. transferyna/PEI/DNA lub anty-CD3/PEI/DNA) z wysoką wydajnością wprowadzają geny do ludzkich komórek nowotworowych mózgu i nerek oraz komórek nabłonka jelitowego [6, 7, 102].

Ostatnio doniesiono, że różne, rozpuszczalne w wodzie, polimery pochodnych metakrylanu i metakrylamidu są zdolne do tworzenia z DNA skondensowanych kompleksów i mogą być stosowane jako domeny wiążące DNA w koniugatach

molekularnych [97]. Van de Wetering i wsp. wykazali, że wydajność transfekcji komórek takimi polipleksami w znacznym stopniu zależy od rodzaju i wielkości cząsteczki polimeru, która jest domeną wiążącą DNA. Najwyższą wydajność transfekcji uzyskano przy zastosowaniu polimeru p(DMAEMA) (ang. *poly[2-(dimethylamino)ethyl methacrylate]*), który w fizjologicznym pH ulega protonowaniu i może działać destabilizująco na błonę endosomu, co w rezultacie prowadzi do rozerwania pęcherzyka i uwolnienia polipleksu do cytoplazmy komórki [97].

Naturalnymi białkami stosowanymi do wiązania DNA w koniugatach molekularnych są spermina i spermidyna [17, 65] oraz histony, białka, które wykazują zarówno zdolność upakowywania DNA, co ułatwia tworzenie małych polipleksów, jak i ułatwiają wnikanie wektorów do jądra komórkowego [3, 12].

4.2. Ligandy koniugatów molekularnych (ang. *cell-specific targeting ligands*)

Skonstruowanie pierwszego polipleksu, w którym gen *CAT* związany w koniugacie molekularnym z PLL i ze specyficznym ligandem (ASOR) został z dużą wydajnością wprowadzony do żądanych komórek (hepatocytów), było początkiem poszukiwań nowych wektorów, które przez wbudowanie właściwie dobranego ligandu zapewniłyby wysoką specyficzność wprowadzania DNA do wielu typów komórek docelowych. ASOR oraz inne asialoglikoproteiny zostały wykorzystane do konstrukcji polipleksów, przy zastosowaniu których można wprowadzać do hepatocytów geny terapeutyczne dla nowotworów wątroby, fenyloketonurii, analbuminemii [88]. W niektórych stanach patologicznych wątroby (cukrzyca, nowotworach, marskości wątroby) ekspresja receptorów asialoglikoproteinowych na powierzchni hepatocytów jest niska, co wyklucza stosowanie polipleksów ASOR/polikation/DNA do specyficznego wprowadzania genów terapeutycznych. Komórki takie można transfekować z dobrą wydajnością wykorzystując koniugaty molekularne, w których ligandem jest białko MCS (ang. *malaria circumsporozite*) [90].

Plank i wsp. wykazali, że asialoorosomukoid, białko, które wiąże się z receptorem asialoglikoproteinowym przez końcową grupę galaktozową, może być w polipleksach ASOR/PLL/DNA zastąpione przez syntetyczny koniugat galaktozowy nie powodując obniżenia wydajności i specyficzności wprowadzania DNA do komórek wątroby [76]. Doniesienie to zapoczątkowało poszukiwania syntetycznych ligandów wiążących się z receptorami komórek, do których mają być wprowadzone terapeutyczne geny.

Często stosowanym naturalnym ligandem, który jest wbudowywany do koniugatów molekularnych jest transferyna. Wykazano w badaniach *in vitro* na komórkach HL-60, SW403, Hep 2, Lovo, że polipleksy transferyna/polikation/DNA mogą być skuteczne w leczeniu m.in. nowotworów płuc i wątroby oraz w terapii genowej leukemii hematopoetycznej [87, 99]. Efektywność wprowadzania genów za po-

średnictwem transferyna/DNA polipeksów można znacznie zwiększyć w obecności takich związków, jak chelator Fe desferioksamina (ang. *desferrioxamine*), które stymulują ekspresję receptorów transferyny na błonie komórek docelowych [14].

Zwiększona ekspresja receptorów dla EGF na komórkach nowotworowych została z powodzeniem wykorzystana do transfekcji różnych komórek rakowych (m. in. raka płuc) za pośrednictwem EGF/polikation/DNA polipeksów [23]. Również inne czynniki wzrostowe są wykorzystywane jako ligandy w koniugatach molekularnych, wówczas gdy komórkami docelowymi dla wprowadzanych genów są komórki wykazujące wysoką ekspresję receptorów dla tego czynnika. Wykorzystując FGF/PLL/DNA polipeksy skutecznie transfekowano ludzkie fibroblasty w hodowli pierwotnej [113].

Wiele typów komórek nowotworowych wykazuje na błonie komórkowej silną ekspresję receptorów folianowych, dlatego polipeksy kwas foliowy /polikation/DNA dają możliwość ukierunkowanego wprowadzania genów do komórek rakowych i zastosowania tych wektorów w terapii genowej nowotworów nerek, jelita, pęcherza, jajnika, mózgu, płuc [23, 37, 104].

W koniugatach molekularnych, które są konstruowane w celu ukierunkowanego wprowadzania genów terapeutycznych do zmienionych chorobowo komórek i tkanek, jako ligandy używane są różne makrocząsteczki, które mogą być specyficznie wiązane przez dany rodzaj komórek np. przeciwciała anty-CD3 i anty-CD5 do transfekcji ludzkich limfocytów T [10, 101], lektyny roślinne i lektyny bakteryjne do transfekcji komórek nabłonka jelitowego i nabłonka oddechowego [111], mannoza jako ligand wiążący polipeksy Man/PEI/DNA z komórkami dendrytycznymi (ang. *dendritic cells*) [24] i wiele innych.

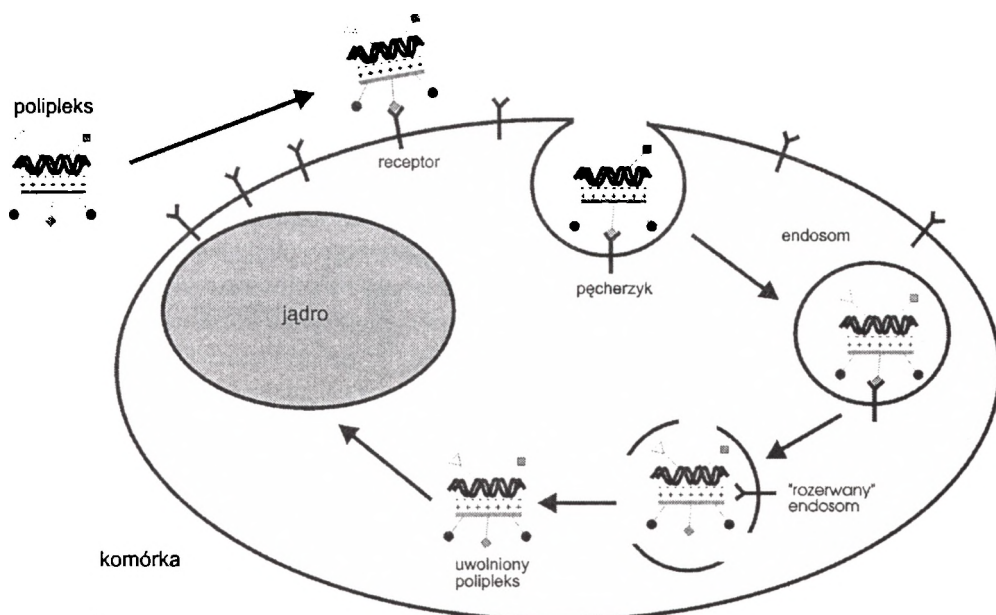
Właściwy dobór liganda i dołączenie go do domeny wiążącej DNA w koniugacie molekularnym zapewnia wysoką specyficzność wiązania wektora z komórką docelową zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, nie gwarantuje jednak zadowalającej wydajności wprowadzania wektora do komórki. Metodę zwiększenia wydajności transfekcji komórek przy zastosowaniu koniugatów molekularnych zaproponowali Muller i wsp. [68]. Autorzy ci jako ligand polipeksu wykorzystali kapsyd ludzkiego wirusa papilloma (HPV). Również replikowane, defektywne adenowirusy zastosowano jako ligandy polipeksów, dzięki którym z dobrą wydajnością wprowadzano geny terapeutyczne zarówno do komórek nowotworowych w hodowli, jak i w organizmie (np. gen supresorowy p53 do komórek raka płuc) [69, 70].

Ostatnio w celu zwiększenia wybiórczości wiązania i wydajności wprowadzania polipeksów do różnych komórek *in vivo* opracowano nowy typ wektorów ligand/polikation/DNA [4, 72]. W wektorach tych PLL lub PEI zostały kowalencyjnie związane z glikolem polietylenowym (PEG). Sprzężenie z PEG (ang. *PEGylation*) dodatkowo naładowanych cząsteczek koniugatów nadaje ich powierzchni ładunek ujemny, co zwiększa ich stabilność i znacząco redukuje wiązanie białek surowicy i agregację polipeksów wprowadzonych do krwioobiegu organizmu docelowego. Podane *in*

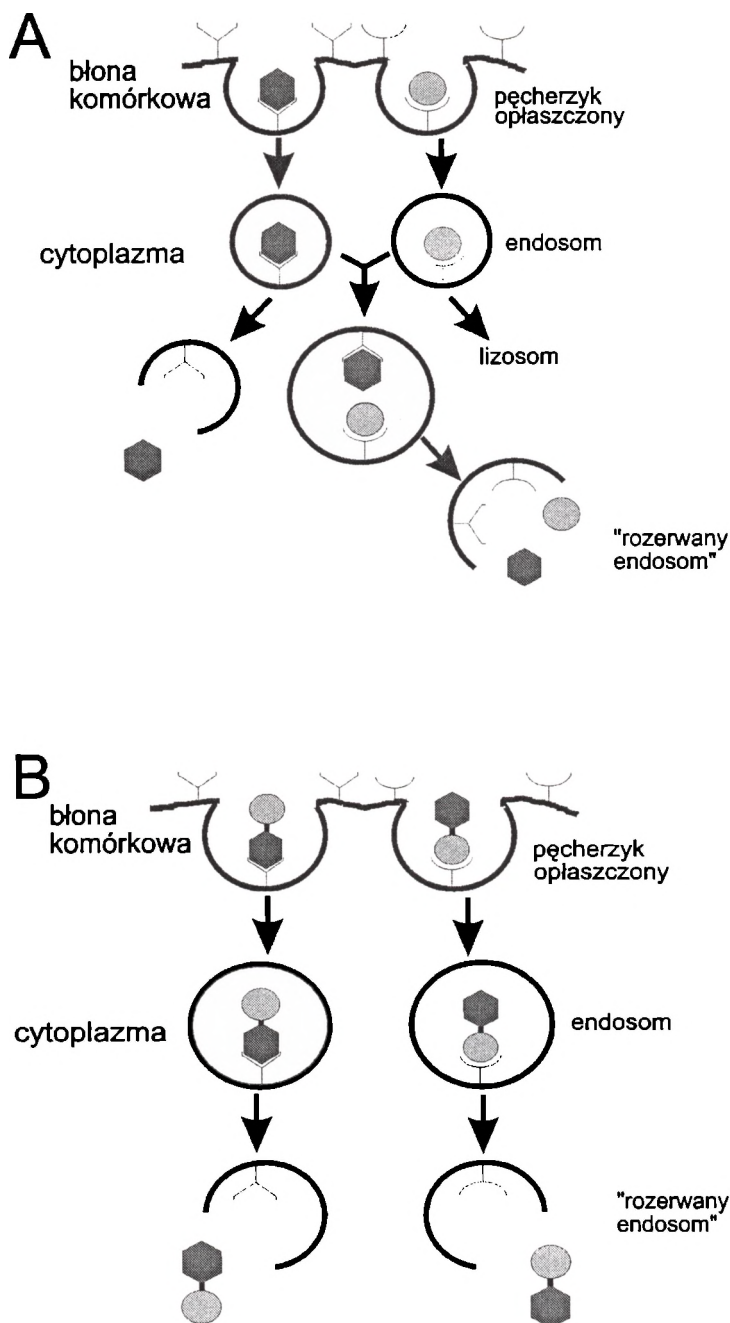
vivo we wlewie dożylnym PEG-polipleksy są również „niewidoczne” dla makrofagów i wykazują większą skuteczność targetingu do komórek docelowych i znacznie wyższą ekspresję wprowadzanych genów, w porównaniu z analogicznie podanymi polipleksami, które nie były związane z glikolem polietylenowym (ang. *non-PEGylated complexes*) [72, 102].

4.3. Składniki uwalniające DNA z endosomów

Koniugat molekularny dostaje się do komórki w drodze endocytozy receptorowej (rys. 2), której przebieg zależy od typu komórki docelowej oraz rodzaju i wielkości cząsteczki polipeksu wiążącego się z receptorem na powierzchni komórki. Zwykle polipleksy ligand/polikation/DNA oddysocjują od receptorów w kwaśnym pH endosomów wczesnych i przechodzą kolejne etapy charakterystyczne dla procesu endocytozy kierowanej receptorami wraz z fuzją endosomu z lizosomem. W celu ograniczenia degradacji przez enzymy lizosomowe wprowadzonego w koniugacie DNA, często transfekcję komórek prowadzi się w obecności związków, które podnoszą pH wewnątrz endosomów (np. chlorochina) [39, 106]. Aby zapobiec fuzji endosomu (zawierającego wprowadzany wektor) z lizosomem, do koniugatów molekularnych wbudowuje się domeny, które pośredniczą w destrukcji endosomów.



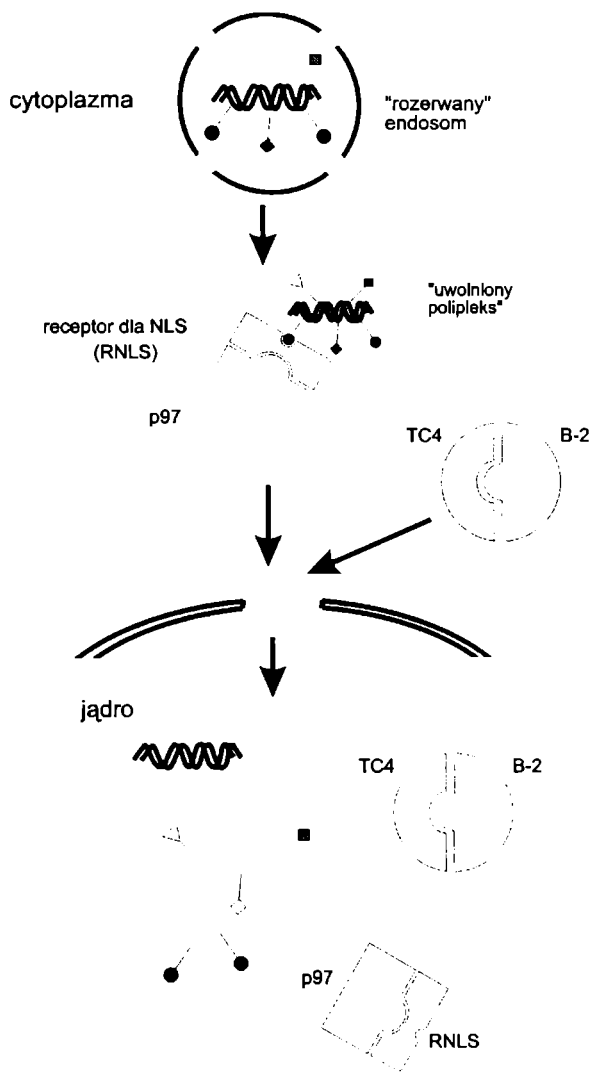
RYSUNEK 2. Wprowadzanie koniugatów molekularnych (polipeksów) do komórki docelowej w drodze endocytozy kierowanej receptorami; (schemat na podstawie rysunku 1 i danych [17, 39, 94, 101])



RYSUNEK 3. Wprowadzanie DNA do komórek wątroby za pośrednictwem polipeksów ASOR/PLL/DNA: A – transfekcja komórek równocześnie defektywnym adenowirusem (sześciąt) i polipeksem ASOR/PLL/DNA (koło). B – transfekcja komórek polipeksem adenowirus-/ASOR/PLL/DNA, opis w tekście w rozdziale 4.3 (wg [18] zmodyfikowane)

Curiel i wsp. opracowali metodę, w której wykorzystali defektywny ludzki adenowirus (dl312 otrzymany z genu Ela) jako czynnik uwalniający koniugaty z endosomów [21]. Adenowirusy są internalizowane do komórek w drodze endocytozy kierowanej receptorami i wydostają się bezpośrednio do cytoplazmy podstawowej komórki gospodarza dzięki fuzji wirusowego kapsydu z błoną endosomu, co prowadzi do utworzenia porów w błonie pęcherzyka i lizy endosomu [38]. Inkubacja komórek ze zreplikowanym defektywnym adenowirusem i polipleksem ligand/PLL/DNA prowadzi do internalizacji obu typów cząstek, które są wiązane niezależnie przez swoje receptory na błonie komórki (rys. 3 A). Dzięki fuzji powstałych pęcherzyków oba rodzaje pobranych makrocząsteczek mogą dostać się do tego samego endosomu, co w końcu prowadzi do lizy pęcherzyka i uwolnienia DNA do cytoplazmy komórki [21]. Zastosowanie tej metody zwiększyło w istotny sposób wydajność wprowadzania genów do komórek docelowych. Opracowano modyfikację tej metody, w której adenowirusy są bezpośrednio dołączane do polipleksów (rys. 3 B). Polipleksy adenowirus/ligand/PLL/DNA po związaniu z receptorem (albo dla ligandu obecnego w koniugacie molekularnym, albo dla adenowirusa) na błonie komórki docelowej, dostają się do endosomów, w których dzięki obecności adenowirusa dochodzi do lizy pęcherzyka i uwolnienia polipleksu do cytoplazmy komórki [22]. W efekcie stosowania kompleksów molekularnych w połączeniu z adenowirusem poziom ekspresji genów wprowadzanych do komórek wzrastał od 1000 do 2000 razy w porównaniu do stosowania samych polipleksów zawierających takie same ligandy (ASOR, transferyna, EGF, FGF, kwas foliowy i inne) [18, 21, 20, 50]. Wykazano, że wykorzystanie polipleksów połączonych z adenowirusami umożliwia również skuteczną transfekcję komórek, które nie posiadają specyficznych receptorów powierzchniowych. Za pomocą polipleksów adeno/EGF/PLL/DNA wprowadzono DNA do komórek raka płuc linii SCLC (ang. *small cell lung cancer*), które wykazują niską ekspresję receptorów EGF [32]. Chociaż adeno-koniugaty charakteryzują się znaczną efektywnością wprowadzania terapeutycznego DNA do komórek docelowych, to ich zastosowanie w terapii genowej *in vivo* jest ograniczone, przede wszystkim z powodu niespecyficznego wprowadzania polipleksów (przez receptory wiążące adenowirusy) do różnych typów komórek, jak również przez wzrost toksyczności spowodowany białkami ludzkich wirusów [18]. Aby obniżyć toksyczność stosowanych adeno-polipleksów, podjęto próby wprowadzania kurzych wirusów jako składnika koniugatu, który doprowadza do lizy endosomów i powoduje uwolnienie DNA do cytoplazmy komórek docelowych, np. kurzy adenowirus (*CELO Virus*) daje bardzo dobre rezultaty w transfekcji komórek ludzkich, porównywalne do otrzymywanych przy stosowaniu ludzkich defektywnych adenowirusów [16].

W celu uniknięcia toksyczności koniugatów molekularnych połączonych z defektywnymi adenowirusami w wielu pracowniach skoncentrowano badania na znalezieniu niewirusowych czynników lizujących. Rafalski i wsp. wyizolowali 20-aminokwasowy, N-końcowy peptyd z hemaglutyniny HA-2 wirusa grypy i wbu-



RYSUNEK 4. Aktywny transport koniugatów molekularnych do jądra komórki, opis w tekście w rozdziale 4.4; (schemat na podstawie rysunku 2 i danych [17, 39, 94, 101])

dowali go do polipleksu transferyna/PLL/DNA. Peptyd ten, przez insercję do błony endosomu i tworzenie w niej porów, które prowadzą do lizy pęcherzyka, ułatwia wprowadzanie DNA do cytoplazmy i jądra komórki docelowej [78, 102].

W ostatnich latach wykazano, że uwolnienie koniugatów molekularnych z endosomu komórki można znacznie ułatwić przez dodanie syntetycznych, amfipatycznych peptydów anionowych, które w kwaśnym pH destabilizują dwuwarstwę lipidową błony i działają podobnie jak peptydy wirusowe. Peptydy takie (np. peptyd GLFEALLELLESLWELLLEA) zwiększają od 100 do 1000 razy wydajność transfekcji różnych linii komórek w hodowli *in vitro*, w zależności od rodzaju peptydu, wielkości cząsteczki wprowadzanego DNA, rodzaju i wielkości polikationu wiążącego DNA i typu komórki docelowej [26, 49].

Innymi czynnikami pośredniczącymi w uwalnianiu DNA z polipleksów wprowadzonych do komórek docelowych są białka strukturalnie zbliżone

do toksyn bakteryjnych, np. białko GD5 odpowiadające podjednostce toksyny krztuśca lub białko ETA strukturalnie przypominające egzotoksynę A bakterii szczepu *Pseudomonas*. Białka te naśladując toksyny bakteryjne omijają w szlaku endocytozy fuzję endosomu z lizosomem i ułatwiają wprowadzanie DNA do jądra komórkowego [31, 96]. Wciąż prowadzone są poszukiwania niewirusowego czynnika, który wbu-

dowując się z polipleksem do endosomu może prowadzić do efektywnego uwalniania wektora do cytoplazmy komórki docelowej.

4.4. Domeny ułatwiające wprowadzenie wektora do jądra komórki (ang. *nuclear localization signals*)

Główną przeszkodą w wykorzystaniu koniugatów molekularnych do terapii genowej jest fakt, że kierunkowo wprowadzony do komórki docelowej gen nie ulega w niej ekspresji, gdyż uwolniony do cytoplazmy koniugat nie dostaje się do jądra komórki [84, 94]. Aby zapewnić aktywny transport koniugatu do jądra, do polikationu wiążącego DNA dołączana jest domena sygnałowa NLS (ang. *nuclear localization signals*) [12], białko lub peptyd zawierający charakterystyczną sekwencję aminokwasową obecną w wielu polipeptydach jądrowych (np. histonie H1). Po uwolnieniu polipleksu z endosomu do cytoplazmy komórki koniugat zostaje rozpoznany przez specyficzny receptor cytoplazmatyczny RNLS (rys. 4). Aktywność receptora RNLS jest stymulowana przez inne cytoplazmatyczne białko zwane p97 [77]. Kompleks RNLS-koniugat molekularny wiązany jest w obrębie poru otoczki jądrowej. Równocześnie kompleks białek B-2 i TC4 stymuluje translokację koniugatu do jądra, uczestniczy w dysocjacji polipleksu i uwolnieniu terapeutycznego DNA, które w jądrze komórki ulega integracji z genomem komórki docelowej i podlega transkrypcji [94].

Ostatnio wykazano doświadczalnie i na podstawie komputerowego modelowania molekularnego, że istotnym czynnikiem limitującym ekspresję wprowadzanego genu jest dysocjacja koniugatu molekularnego w jądrze i uwolnienie DNA, które w znacznej mierze zależy od wielkości i rodzaju cząsteczki polikationu wiążącego DNA [84]. Jak doniesiono z pracowni Wagnera, ekspresja genów wprowadzanych za pomocą polipleksów do komórek w hodowli *in vitro* w istotny sposób zależy również od fazy cyklu komórkowego, w której znajdują się transfekowane komórki. Gdy komórki znajdowały się w fazie S lub G2, aktywność luciferazy, której gen wprowadzano za pośrednictwem różnych typów polipleksów (np. transeryna/PLL lub transferyna/PEI lub adeno/PEI), była od 30 do 500 razy wyższa niż w transfekowanych komórkach, które znajdowały się w fazie G1 cyklu [8]. Wyniki tych doświadczeń wskazują na potencjalnie znacznie większą przydatność stosowania polipleksów do wprowadzania genów terapeutycznych do komórek szybko dzielących się niż do komórek nie proliferujących.

5. ZALETY I OGRANICZENIA KONIUGATÓW MOLEKULARNYCH

Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach wskazują, że koniugaty molekularne mogą stać się znacznie bardziej wszechstronnymi wektorami niż inne

dotychczas stosowane. Wektory te wykazują największą specyficzność targetingu genów terapeutycznych lub oligonukleotydów do wielu typów komórek, umożliwiają ich wprowadzanie zarówno do komórek *in vitro*, jak i *in vivo*, mogą być wykorzystane przy przenoszeniu genów do komórek proliferujących i komórek nie dzielących się. Wektory te pozbawione są szeregu ograniczeń, które mają wektory wirusowe, takich jak: niebezpieczeństwo integracji genomu wirusa z genomem komórki gospodarza, możliwość przypadkowej eliminacji komórek docelowych oraz neutralizacji lub zniszczenia produktu wprowadzonego genu terapeutycznego przez białka wirusa, który został zastosowany jako wektor [17, 34, 81].

Obecnie stosowanie polipleksów do wprowadzania genów terapeutycznych do komórek ma dwa główne ograniczenia: stosunkowo niską wydajność transferu genów i często przejściową ekspresję wprowadzanych genów. Najbardziej obiecującymi zaletami tych wektorów jest potencjalne bezpieczeństwo ich stosowania oraz znacznie większa niż innych wektorów kierunkowość wprowadzania genów [17, 94]. Wyniki badań przeprowadzonych w różnych pracowniach na wielu typach komórek w hodowli oraz na zwierzętach pozwalają przypuszczać, że koniugaty molekularne będą mogły być stosowane do leczenia chorób zarówno metodami *ex vivo*, *in situ* (miejscowo), jak też *in vivo*. Odpowiedni wybór polipleksu zapewniający wysoką skuteczność targetingu daje potencjalną możliwość stosowania tych wektorów nawet w przypadkach, gdy sukces terapeutyczny zależy od eliminacji komórek docelowych. Wysoka wybiórczość transferu genów do komórek docelowych za pośrednictwem polipleksów wskazuje na możliwość zastosowania tych wektorów w terapii chorób dziedzicznych, która nie wymaga znacznej wydajności wprowadzania genu terapeutycznego.

W leczeniu wielu chorób dziedzicznych zazwyczaj wystarcza, aby tylko część zmienionych chorobowo komórek została „naprawiona” i zaczęła prawidłowo funkcjonować. W terapii genowej wielu chorób nabytych, a szczególnie nowotworów (do leczenia których wciąż poszukuje się nowych, skutecznych metod), konieczna jest zarówno doskonała selektywność, jak i duża wydajność transferu genów. Jak wskazują wyniki doświadczeń przeprowadzanych na różnych typach komórek nowotworowych, koniugaty molekularne, które wykorzystują drogę endocytozy kierowanej receptorami do wnikania do komórek, spełniają wymóg wybiórczego wprowadzania DNA do komórek docelowych najlepiej ze wszystkich dotychczas stosowanych wektorów [17, 23, 39, 104]. Aby osiągnąć zadowalającą wydajność targetingu do komórek nowotworowych, istotne wydaje się dobranie odpowiedniej strategii terapii antynowotworowej. Omówienie tego zagadnienia mogłoby być tematem niezależnego artykułu i zostało w mniej lub bardziej szczegółowy sposób opisane w kilku artykułach przeglądowych [43, 55, 86], dlatego zasygnalizuję tylko najważniejsze ze stosowanych strategii. Są to:

- wprowadzanie do komórek nowotworowych genów „samobójczych”,
- immunostymulacja,
- „naprawa nowotworów” za pomocą terapii antysensowej przez wprowadzanie do komórek oligonukleotydów, które hybrydując z DNA gospodarza lub mRNA genu docelowego, powodują „wyciszenie” onkogenów lub stymulację antyonkogenów i mogą hamować niekontrolowane podziały komórek [59].

Wyniki badań przeprowadzonych na różnych komórkach nowotworowych w hodowli *in vitro* oraz *in vivo* na zwierzętach pozwalają przypuszczać, że koniugaty molekularne będą mogły być wprowadzone do prób klinicznych do leczenia różnych typów nowotworów ludzkich po opracowaniu optymalnej strategii terapii [33, 60, 88, 104].

Porównanie polipleksów z innymi dotychczas stosowanymi wektorami wskazuje, że prawdopodobnie wkrótce koniugaty molekularne zostaną dopuszczone do prób klinicznych i w najbliższej przyszłości staną się bardzo dobrym narzędziem w terapii genowej. Wydaje się też możliwe, że w krótkim czasie zostaną skonstruowane tzw. „syntetyczne wirusy”, które zachowując wszystkie zalety koniugatów będą miały zdolność kierunkowego uwalniania wprowadzanych genów, którą można osiągnąć przez dołączenie do wektora, obok wprowadzanego genu, również promotora tkankowo-specyficznego odpowiadającego za wybiórczą transkrypcję genu terapeutycznego [17, 34, 33, 81]. Należy pamiętać, że wektory przyszłości powinny cechować się wysoką pojemnością, wydajnością i selektywnością, zapewniać właściwą integrację genu terapeutycznego z genomem komórki gospodarza oraz działać bez wywoływania skutków ubocznych. Znalezienie za pomocą inżynierii komórkowej takich wektorów rozwiązałoby problem targetingu genów i oligonukleotydów skierowany selektywnie do wybranych komórek i pozwoliłoby wielokrotnie obniżyć bardzo wysokie dotychczasowe koszty terapii genowej wielu chorób [52].

LITERATURA

- [1] ANDERSON WF. Human gene therapy. *Nature* 1998; **392**(6679Suppl): 25–30.
- [2] ANDREASON GL, EVANS GA. Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechnology* 1988; **6**: 650–659.
- [3] BALICKI D, BEUTLER E. Histone H2A significantly enhances *in vitro* DNA transfection. *Mol Med* 1997; **3**: 782–787.
- [4] BENNS JM, KIM SW. Tailoring new gene delivery designs for specific targets. *J Drug Target* 2000; **8**: 1–12.
- [5] BIEWENGA JE, DESTREE OH, SCRAMA LH. Plasmid-mediated gene transfer in neurones using the biolistics technique. *J Neurosci Methods* 1997; **71**: 67–75.
- [6] BOLETTA A, BENIGNI A, LUTZ J, REMUZZI G, SORIA MR, MONACO L. Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 1243–1251.
- [7] BOUSSIFO, LEZOUALCH F, ZANTA MA, MERGNY M, SCHERMAN D, DEMENEIX B, BEHR JR. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7297–7301.

- [8] BRUNNER S, SAUER T, CAROTTA S, COTTEN M, SALTIK M, WAGNER E. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* 2000; **7**: 401–407.
- [9] BUELER H. Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy. *J Biol Chem* 1999; **380**: 618–622.
- [10] BUSCHLE M, COTTEN M, KIRLAPPOS H, MECHTLER K, SCHAFFNER G, ZAUNER W, BIRSTIEL ML, WAGNER E. Receptor-mediated gene transfer into human T lymphocytes via binding of DNA/CD3 antibody particles to the CD3 T cell receptor complex. *Hum Gene Ther* 1995; **6**: 753–761.
- [11] CELIS JE. Microinjection of somatic cells with micropipettes: Comparison with other techniques. *Biochem J* 1984; **223**: 281–291.
- [12] CHEN J, STICKLES R, DAICHENDT K. Galactosylated histone-mediated gene transfer and expression. *Hum Gene Ther* 1994; **5**: 429–436.
- [13] COSTELLO E, MUNOZ M, BUETTI E, MEYLAN PR, DIGGELMANN H, THALI M. Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther* 2000; **7**: 596–604.
- [14] COTTEN M, LANGLE-ROUAULT F, KIRLAPPOS H, WAGNER E, MECHTLER K, ZENKE M, BEUG H, BIRSTIEL ML. Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukaemic cells: stimulation by agent that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 4033–4037.
- [15] COTTEN M, WAGNER E. Non-viral approaches to gene therapy. *Curr Opin Biotechnol* 1993; **4**: 705–710.
- [16] COTTEN M, WAGNER E, ZATLOUKAL K, BIRSTIEL ML. Chicken adenovirus (CELO virus) particles augment receptor-mediated DNA delivery to mammalian cells and yield exceptional levels of stable transformants. *J Virol* 1993; **67**: 3777–3785.
- [17] CRISTIANO RJ. Targeted, non-viral gene delivery for cancer gene therapy. *Front Biosci* 1998; **3**: d1161–1170.
- [18] CRISTIANO RJ, SMITH LC, KAY MA, BRINKLEY BR, WOO SLC. Hepatic gene therapy: efficient gene delivery and expression in primary hepatocytes utilising a conjugated adenovirus-DNA complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; **90**: 11548–11552.
- [19] CRYSTAL RG. The gene as the drug. *Nature Medicine* 1995; **1**: 15–17.
- [20] CUIEL DT. Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **886**: 158–171.
- [21] CUIEL DT, AGARWAL S, WAGNER E, COTTEN M. Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 8850–8854.
- [22] CUIEL DT, WAGNER E, COTTEN M, BIRSTIEL ML, AGARWAL S, LI C, LOEHEL S, HU P. High-efficiency gene transfer mediated by adenovirus coupled to DNA-polylysine complexes. *Hum Gene Ther* 1992; **3**: 147–154.
- [23] DACHS GU, DOUGHERTY GJ, STRATFORD IJ, CHAPLIN DJ. Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 1997; **9**: 313–325.
- [24] DIEBOLD SS, KURSA M, WAGNER E, COTTEN M, ZENKE M. Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells. *J Biol Chem* 1999; **274**: 19087–19094.
- [25] DUCKERS HJ, NABEL EG. Prospects for genetic therapy of cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 2000; **84**: 199–213.
- [26] DUGUID JG, LI C, SHI M, LOGAN MJ, ALILA H, ROLLAND A, TOMLINSON E, SPARROW JT, SMITH LC. A physicochemical approach for predicting the effectiveness of peptide-based gene delivery systems for use in plasmid-based gene therapy. *Biophys J* 1998; **74**: 2802–2814.
- [27] DUNBAR C, CHANG L, MULLEN C, RAMSEY WJ, CARTER C, KOHN D, PARKMAN R, LENARSKY C, WEINBERG K, WARA D, CULVER KW, ANDERSON WF, LEITMAN

- S, FLEISHER T, KLEIN H, SHEARER G, CLERICI M, McGARRITY G, BASTIAN J, HERSHFELD MS. Amendment to Clinical Research Project 90-C-195. April 1, 1993. Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with autologous lymphocytes transduced with a human ADA gene. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 477–488.
- [28] DUNBAR C, KOHN D, SCHIFFMANN R, BARTON NW, NOLTA JA, ESPLIN JA, PENSIERO M, LONG Z, LOCKEY C, EMMONS RV, CSIK S, LEITMAN S, KREBS CB, CARTER C, BRADY, KARLSSON S. Retroviral transfer of the glucocerebrosidase gene into CD34+ cells from patients with Gaucher disease: *in vivo* detection of transduced cells without myeloablation. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 2629–2640.
- [29] FELDMAN LJ, STEG G. Optimal techniques for arterial gene transfer. *Cardiovasc Res* 1997; **35**: 391–404.
- [30] FLOTTE T, CARTER B, CONRAD C, GUGGINO W, REYNOLDS T, ROSENSTEIN B, TAYLOR G, WALDEN S, WETZEL R. A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 1996; **7**: 1145–1159.
- [31] FOMINAYA J, WELS W. Target cell-specific DNA transfer mediated by a chimeric multi-domain protein. Novel non-viral gene delivery system. *J Biol Chem* 1996; **271**: 10560–10568.
- [32] FREDERIKSEN KS, ABRAHAMSEN N, CRISTIANO RJ, DAMMSTRUP L, POULSEN HS. Gene delivery by an epidermal growth factor/DNA polyplex to small cell lung cancer cell lines expressing low levels of epidermal growth factor receptor. *Cancer Gene Ther* 2000; **7**: 262–268.
- [33] FREDERIKSEN KS, PETRI A, ABRAHAMSEN N, POULSEN HS. Gene therapy for lung cancer. *Lung Cancer* 1999; **23**: 191–207.
- [34] GARNETT MC. Gene-delivery systems using cationic polymers. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1999; **16**: 147–207.
- [35] GAVAGHAN H. NIH wins patent on basic technique covering all *ex vivo* gene therapy. *Nature* 1995; **374**: 393.
- [36] GODBEY WT, WU KK, MIKOS AG. Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 5177–5181.
- [37] GOTTSCHALK S, CRISTIANO RJ, SMITH L, WOO SLC. Folate-mediated gene delivery and expression *in vitro*. *Gene Ther* 1994; **1**: 185–191.
- [38] GREBER U, WILLETTS M, WEBSTER P, HELENIUS A. Stepwise dismantling of adeno-virus 2 during entry into cells. *Cell* 1993; **75**: 477–486.
- [39] GUY J, DRABEK D, ANTONIOU M. Delivery of DNA into mammalian cells by receptor-mediated endocytosis and gene therapy. *Mol Biotechnol* 1995; **3**: 237–248.
- [40] HERMENS WT, VERHAAGEN J. Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; **55**: 399–432.
- [41] HSIEH JT, DINNEY CP, CHUNG LW. The potential role of gene therapy in the treatment of bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2000; **27**: 103–113.
- [42] HUARD J, KRISKY D, OLIGINO T, MARCONI P, DAY CS, WATKINS SC, GLORIOSO JC. Gene transfer to muscle using herpes simplex virus-based vectors. *Neuromuscul Disord* 1997; **7**: 299–313.
- [43] HUMINIECKI Ł. Terapia genowa – wektory i strategie. *Post Biochem* 1995; **41**: 230–236.
- [44] HUMINIECKI Ł. Somaticzna terapia genowa – czy jest bezpieczna? *Post Biochem* 1996; **42**: 14–21.
- [45] KALPANA GV. Retroviral vectors for liver-directed gene therapy. *Semin Liver Dis* 1999; **19**: 27–37.
- [46] KANEDA Y, SAEKI Y, MORISHITA R. Gene therapy using HVJ-liposomes: the best of both worlds? *Mol Med Today* 1999; **5**: 298–303.
- [47] KATO Y, SUGIYAMA Y. Targeted delivery of peptides, proteins, and genes by receptor mediated endocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; **14**: 287–331.

- [48] KAY MA, MANNO CS, RAGNI MV, LARSON PJ, COUTO LB, McCLELLAND A, GLADER B, CHEW AJ, TAI SJ, HERZOG RW, ARRUDA V, JOHNSON F, SCALLAN C, SKARSGARD E, FLAKE AW, HIGH KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genet* 2000; **24**: 257–261.
- [49] KICHLER A, FREULON I, BOUTIN V, MAYER R, MONSIGNY M, MIDOUX P. Glycofection in the presence of anionic fusogenic peptides: a study of the parameters affecting the peptide-mediated enhancement of the transfection efficiency. *J Gene Med* 1999; **1**: 134–143.
- [50] KIRCHEIS R, SCHULLER S, BRUNNER S, OGRIS M, HEIDER KH, ZAUNER W, WAGNER E. Polycation-based DNA complexes for tumour-targeted gene delivery *in vivo*. *J Gene Med* 1999; **1**: 111–120.
- [51] KLIMATCHEVA E, ROSENBLATT JD, PLANELLES V. Lentiviral vectors for liver-directed gene therapy. *Front Biosci* 1999; **4**: D481–D496.
- [52] KOROHOA W. Czy inżynieria komórkowa stanowi zagrożenie. *Prace Komisji Zagrożeń Cywilizacyjnych PAU* 2000; **3**: 7–18.
- [53] KOROHOA W, MADEJA Z. Wprowadzanie cząsteczek do komórek w drodze odwracalnej perforacji błon. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 89–95.
- [54] KOSZ-VNENCHAK M, FORYST A. Wykorzystanie wirusów jako wektorów w terapii genowej. *Mikrobiologia Medycyna* 1997; **3**: 22–28.
- [55] KOURAKLIS G. Progress in cancer gene therapy. *Acta Oncol* 1999; **38**: 675–683.
- [56] LAMOTHE B, JOSHI S. Current developments and future prospects for HIV gene therapy using interfering RNA-based strategies. *Front Biosci* 2000; **5**: D527–D555.
- [57] LANGER JC, KLOTMAN ME, HANSS B, TULCHIN N, BRUGGEMAN LA, KLOTMAN PE, LIPKOWITZ MS. Adeno-associated virus gene transfer into renal cells: potential for *in vivo* gene delivery. *Exp Nephrol* 1998; **6**: 189–194.
- [58] LATCHMAN DS, COFFIN RS. Viral vectors in the treatment of Parkinsons disease. *Mov Disord* 2000; **15**: 9–17.
- [59] LIANG E, AJMANI PS, HUGHES JA. Oligonucleotide delivery: a cellular prospective. *Pharmazie* 1999; **54**: 559–566.
- [60] MAHATO RI, SMITH LC, ROLLAND A. Pharmaceutical perspectives of nonviral gene therapy. *Adv Genet* 1999; **41**: 95–156.
- [61] MARASCO WA, LaVECCHIO J, WINKLER A. Human anti-HIV-1 tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1-infection and AIDS. *J Immunol Methods* 1999; **231**: 223–238.
- [62] MAYER A. Intracellular membrane fusion: SNAREs only? *Current Opinion Cell Biol* 1999; **11**: 447–452.
- [63] MELLMAN I, WARREN G. The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 2000; **100**: 99–112.
- [64] MICHALIK M. Wprowadzanie makrocząsteczek do komórek przez fuzję z liposomami i cieniami erytrocytów. *Post Biol Kom* 1994; **21**: 97–118.
- [65] MOHR L, SCHAUER JI, BOUTIN RH, MORADPOUR D, WANDS JR. Targeted gene transfer to hepatocellular carcinoma cells *in vitro* using a novel monoclonal antibody-base gene delivery system. *Hepatology* 1999; **29**: 82–89.
- [66] MUKHERJEE S, GHOSH RN, MAXFIELD FR. Endocytosis. *Physiol Rev* 1997; **77**: 759–803.
- [67] MUKHTAR M, DUKE H, BOUHAMDAN M, POMERANTZ RJ. Anti-human immunodeficiency virus type 1 gene therapy in human central nervous system-based cells: an initial approach against a potential viral reservoir. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 347–359.
- [68] MULLER M, GISSMANN L, CRISTIANO RJ, SUN XY, FRAZER IH, JENSON AB, ALONSO A, ZENTGRAF H, ZHOU J. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol* 1995; **69**: 948–954.
- [69] NGUYEN DM, WIEHLE SA, KOCH PE, BRANCH C, YEN N, ROTH JA, CRISTIANO RJ. Delivery of the p53 tumour suppressor gene into lung cancer cells by an adenovirus/DNA/complex. *Cancer Gene Ther* 1997; **4**: 191–198.

- [70] NGUYEN DM, WIEHLE SA, ROTH JA, CRISTIANO RJ. Gene delivery in malignant cells *in vivo* by a conjugated adenovirus/DNA/complex. *Cancer Gene Ther* 1997; **4**: 183–190.
- [71] NOWROOZI MR, PISTERS LL. The current status of gene therapy for prostate cancer. *Cancer Control* 1998; **5**: 522–531.
- [72] OGRIS M, BRUNNER S, SCHULLER S, KIRCHEIS R, WAGNER E. PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery. *Gene Ther* 1999; **6**: 595–605.
- [73] PEARSON AS, BOUVET M, EVANS DB, ROTH JA. Gene therapy and pancreatic cancer. *Front Biosci* 1998; **3**: e230–237.
- [74] PENG KW, RUSSELL SJ. Viral vector targeting. *Curr Opin Biotechnol* 1999; **10**: 454–457.
- [75] PEPLINSKI GR, TSUNG K, NORTON JA. Vaccinia virus for human gene therapy. *Surg Oncol Clin N Am* 1998; **7**: 575–588.
- [76] PLANK C, ZATLOUKAL K, COTTEN M, MECHTLER K, WAGNER E. Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra-antennary galactose ligand. *Bioconjug Chem* 1992; **3**: 533–539.
- [77] POWERS MA, FORBES DJ. Cytosolic factors in nuclear transport: whats importing? *Cell* 1994; **79**: 931–934.
- [78] RAFALSKI M, ORTIZ A, ROCKWELL A, VanGINKEL LC, LEAR JD, DeGRADO WF, WILSCHUT J. Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: interaction of HA2 N-terminal peptides with phospholipid vesicles. *J Biochem* 1991; **30**: 10211–10220.
- [79] ROBBINS PD, GHIVIZZANI SC. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther* 1998; **80**: 35–47.
- [80] RODMAN SJ, WANDINGER-NESS A. Rab GTPases coordinate endocytosis. *J Cell Sci* 2000; **113**Pt2: 183–192.
- [81] ROLLAND AP. From gene to gene medicines: recent advances in nonviral gene delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1998; **15**: 143–198.
- [82] ROBERT C. Liposomes as a gene delivery system. *Braz J Med Biol Res* 1999; **32**: 163–169.
- [83] ROSENECKER J, SCHMALIX WA, SCHINDELHAUER D, PLANK C, REINHARDT D. Towards gene therapy of cystic fibrosis. *Eur J Med Res* 1998; **3**: 149–156.
- [84] SCHAFFER DV, FIDELMAN NA, DAN N, LAUFFENBURGER DA. Vector unpacking as a potential barrier for receptor-mediated polyplex gene delivery. *Biotechnol Bioeng* 2000; **67**: 598–606.
- [85] SCHAFFER DV, LAUFFENBURGER DA. Optimisation of cell surface binding enhances efficiency and specificity of molecular conjugate gene delivery. *J Biol Chem* 1998; **273**: 28004–28009.
- [86] SCHMIDT-WOLF GD, SCHMIDT-WOLF IGH. Cancer and gene therapy. *Ann Hematol* 1996; **73**: 207–218.
- [87] SINGH M. Transferrin as a targeting ligand for liposomes and anticancer drugs. *Curr Pharm Des* 1999; **5**: 443–451.
- [88] SMITH RM, WU GY. Hepatocyte-directed gene delivery by receptor-mediated endocytosis. *Semin Liver Dis* 1999; **19**: 83–92.
- [89] SNYDER RO. Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med* 1999; **1**: 166–175.
- [90] SOSNOWSKI BA, GONZALEZ AM, CHANDLER LA, BUECHLER YE, PIERCE GF, BAIRD A. Targeting DNA to cells with basic fibroblast growth factor (FGF2). *J Biol Chem* 1996; **271**: 33647–33653.
- [91] STEPHAN D, WELTIN D, ZARIC V. Gene therapy for coronary disease. *Ann Endocrinol* 2000; **61**: 85–90.
- [92] STONE D, DAVID A, BOLOGNANI F, LOWENSTEIN PR, CASTRO MG. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. *J Endocrinol*. 2000; **164**: 103–118.

- [93] SWAAN PW. Recent advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor-mediated transport pathways. *Pharm Res* 1998; **15**: 826–834.
- [94] SZALA S. Synthetic virus-like gene transfer system. *Post Bioch* 1995; **41**: 318–321.
- [95] TIBERGHIE P, CAHN JY, BRION A, DECONINCK E, RACADOT E, HERVE P, MILPIED N, LIOURE B, GLUCKMAN E, BORDOGNONI P, JACOB W, CHIANG Y, MARCUS S, REYNOLDS C, LONGO D. Use of donor T-lymphocytes expressing herpes-simplex thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation: a phase I-II study. *Hum Gene Ther* 1997; **8**: 615–624.
- [96] UHEREK C, FOMINAYA J, WELS W. A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* 1998; **273**: 8835–8841.
- [97] VanDeWETERING P, MORET EE, SCHUURMANS-NIEUWENBROEK NM, VAN STEENBERGEN MJ, HENNINK WE. Structure-activity relationships of water soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. *Bioconjug Chem* 1999; **10**: 589–597.
- [98] WAGNER E, COTTEN M, FOISNER R, BIRNSTIEL ML. Transferrin-polycation- DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 4255–4259.
- [99] WAGNER E, ZENKE M, COTTEN M, BEUG H, BIRNSTIEL ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 3410–3414.
- [100] WAGNER JA, MORAN ML, MESSNER AH, DAIFUKU R, CONRAD CK, REYNOLDS T, GUGGINO WB, MOSS RB, CARTER BJ, WINE JJ, FLOTTE TR, GARDNER P. A phase I/II study of tg AAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 1998; **9**: 889–909.
- [101] WAGNER JA, OGRIS M, ZAUNER W. Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998; **30**: 97–113.
- [102] WAGNER E. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1999; **38**: 279–289.
- [103] WALTERS RW, DUAN D, ENGELHARD JF, WELSH MJ. Incorporation of adeno-associated virus in calcium phosphate coprecipitate improves gene transfer to airway epithelia *in vitro* and *in vivo*. *J Virol* 2000; **74**: 535–540.
- [104] WANG S, LOW PS. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. *J Controlled Release* 1998; **53**: 39–48.
- [105] WICKHAM TJ. Targeting adenovirus. *Gene Ther* 2000; **7**: 110–114.
- [106] WU Y, BOYSUN MJ, CSENSITS KL, PASCUAL DW. Gene transfer facilitated by a cellular targeting molecule, reovirus protein sigma 1. *Gene Ther* 2000; **7**: 61–69.
- [107] WU GY, WILSON JM, SHALABY F, GROSSMAN M, SHAFRITZ DA, WU CH. Receptor-mediated gene delivery *in vivo*. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14338–14342.
- [108] WU GY, WU CH. Receptor-mediated *in vitro* transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem* 1987; **262**: 4429–4432.
- [109] WU GY, WU CH. Receptor-mediated gene delivery and expression *in vivo*. *J Biol Chem* 1988; **263**: 14621–14624.
- [110] XU B, WIEHLE S, ROTH JA, CRISTIANO RJ. The contribution of poly-L-lysine, epidermal growth factor, and streptavidin to EGF/PLL/DNA polyplex formation. *Gene Ther* 1998; **5**: 1235–1243.
- [111] YIN W, CHENG PW. Lectin conjugate-directed gene transfer to airway epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; **205**: 826–833.
- [112] YONEMITSU Y, ALTON EW, KOMORI K, YUSHIZUMI T, SUGIMACHI K, KANNEDA Y. HVJ (Sendai virus) liposome-mediated gene transfer: current status and future perspectives (review). *Int J Oncol* 1998; **16**: 1277–1285.

- [113] ZAUNER W, BRUNNER S, BUSCHLE M, OGRIS M, WAGNER E. Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1428**: 57–67.
- [114] ZHANG WW, JOSEPHS SF, ZHOU J, FANG X, ALEMANY R, BALAGUE C, DAI Y, AYARES D, PROKOPENKO E, LOU YC, SETHI E, HUBERT-LESLIE D, KENNEDY M, RUIZ L, ROCKOW-MAGNONE S. Development and application of minimal-adenoviral vector system for gene therapy of haemophilia A. *Thromb Haemost* 1999; **82**: 562–571.

Adres autora: 31-120 Kraków, Al. Mickiewicza 3, tel.: 634-13-55 w. 262
e-mail: Marta@mol.uj.edu.pl